

審査の結果の要旨

氏名 岡本 卓

アルツハイマー病は、全世界で、患者数が 1500 万人を数える、老人性痴呆疾患の代表であり、その病態の解明と、治療法の創成が急務となっている。同病の特徴的病理所見のひとつ、老人斑の主成分であるベータアミロイドペプチドの研究から、その前駆体蛋白である、ベータアミロイド蛋白前駆体の機能解明が最重要研究課題のひとつと認識されるようになった。当該研究では、同前駆体に三量体型 GTP 結合蛋白質を介した細胞内シグナル伝達作用があることを見出し、以下の結果を得ている。

1. まず第一に、IGF-II 受容体の細胞内ドメインに存在する 14 アミノ酸残基からなる領域が、Gi2 の活性化領域であることを特定した。この領域のアミノ酸配列からなる合成ペプチド (P14 と命名) は、精製 Gi2 の活性化を容量、時間依存性に惹起することができた。また、この活性化には、マイクロモル濃度程度のマグネシウムイオンが必要であったこと、百日咳毒素の前処理により、P14 による Gi2 の活性化を完全に抑止できたことから、このペプチドは、受容体様に Gi2 を活性化することが判明した。ナノモル濃度の Gi2 の活性化に、P14 は、大過剰のマイクロモル濃度が必要であったが、脂質膜上に再構成した Gi2 においては、IGF-II 受容体の膜貫通領域の一部を P14 に付加することで、活性化に必要な濃度は、Gi2 のそれとほぼ匹敵する程度に減少させることができ、P14 による Gi2 の活性化は、生理的条件下でも起こりうる現象であることを示した。一方、IGF-II 受容体と Gi2 を再構成したベジクルに、P14 に対する抗体を導入することで、IGF-II 依存性の Gi2 の活性化を遮断することが出来た。以上の結果から、IGF-II 受容体の P14 領域は、リガンド依存性の Gi2 活性化領域であることが証明されたといえる。つまり、1 回膜貫通構造受容体である IGF-II 受容体は、短い一次アミノ酸配列からなる細胞内の一部領域を機能ドメインとして用いることで、Gi2 との共役を可能にすることが明らかになり、この考えかたをいわゆる G 蛋白共役受容体である 7 回膜貫通構造受容体にも適応した場合、同受容体の場合もまた、短い一次アミノ酸配列が G 蛋白質共役機構の本質を担う新たな可能性を提示したことになる。また、P14 ペプチドのアミノ酸配列に網羅的に変異を加えることで、Gi2 の活性化に必要とされるアミノ酸配列上の

条件の演繹に成功した。

2. この条件を用いて、いわゆる Gi 蛋白質と共役することが知られている 7 回膜貫通構造受容体に対して、独自のプログラムを作成することで、データベースを用いて検索を行ったところ、ムスカリン受容体、アルファアドレナリン受容体、ドーパミン受容体の細胞内ドメインに、G 蛋白質共役候補配列を見出す事ができた。そして、これら配列に対する合成ペプチドを作成し、G 蛋白質活性化能を検定したところ、これら受容体のリガンド依存性の G 蛋白質共役配列として作動している可能性の高い領域を選び出す事ができた。

3. そこで、この条件を用いて、Gs と共役することが知られるベータ 2 アドレナリン受容体の細胞内ドメインに Gs 共役配列を求めたところ、条件に合致する領域を第 3 細胞内ループの C 末部分に見い出す事ができた。実際、その部分の配列を持つ合成ペプチドは、精製 Gs を受容体様に活性化することができた。また、弱いながら、Gi を活性化する能力も有していた。また、この合成ペプチドは、膜アデニール酸シクラーゼを活性化することができた。この領域には、プロテインキナーゼ A によりリン酸化されるセリン残基が含まれていた。そこで、このセリン残基をリン酸化した合成ペプチドの Gi, Gs に対する効果を検討したところ、非リン酸化状態に比し、Gs に対する活性化能は有意に減弱していたが、逆に、Gi に対する活性化作用の有意な増強を認めた。実際、リン酸化ペプチドは、膜アデニール酸シクラーゼを活性化する能力を失っていた。以上の結果から、ベータ 2 アドレナリン受容体の Gs 共役領域は、第 3 細胞内ループの C 末部分に存在すること、そして、この領域は、自身の出力であるプロテインキナーゼ A によって、リン酸化を受けること、リン酸化により、Gs 活性化能を失い、逆に、Gi 活性化能を獲得することが判明したといえる。

4. G 蛋白質共役候補配列探索条件の有用性が証明されたことを受けて、それまで、機能が不明であったアルツハイマー病の原因遺伝子の一つ、ベータアミロイド前駆体蛋白の機能解析を施行したところ、その細胞内ドメインにこの条件に合致する領域を見出す事ができた。つまり、同前駆体には、G 蛋白質活性化機能が存在する可能性が示唆されたといえる。そこで、実際、この領域に G 蛋白質活性化能があるか否かの検討を試みた。まず、この領域に対応する合成ペプチドの各種精製 G 蛋白質に対する効果を検討したところ、脳 G 蛋白質である Go を選択的に活性化することが判明した。その活性化は、百日咳毒素により阻害を受け、マグネシウム濃度に依存したことから、受容体様の様式を

とすることも明かとなった。つまり、ベータアミロイド蛋白前駆体は、Go と共役する脳受容体である可能性が提示されたといえる。

5. ベータアミロイド蛋白前駆体と精製 Go を人工脂質膜上に再構成し、抗ベータアミロイド蛋白前駆体抗体で、刺激を加えた。Go の活性化は、抗ベータアミロイド蛋白前駆体抗体により、容量、時間依存性に生じた。この活性化は、百日咳毒素の前処理により、阻害を受け、抗 Go 共役配列抗体により、容量依存性に阻害された。また、マグネシウム濃度依存性に活性化が認められた。さらには、Gi2 と同前駆体を再構成した人工脂質膜では、G 蛋白質の活性化は、抗ベータアミロイド蛋白前駆体抗体によっては惹起されなかった。以上のことから、ベータアミロイド蛋白前駆体は、Go と選択的に共役する機能的受容体である可能性が示唆されたといえる。

6. 家族性アルツハイマー病の変異を持つ前駆体を精製し、Go 分子と、人工脂質膜に再構成し、Go の活性を抗ベータアミロイド蛋白前駆体刺激下、非刺激下の両者の条件下に検討した。Go との再構成により、抗ベータアミロイド蛋白前駆体非刺激下において、すでに、Go は活性化されていた。つまり、Go の構成的活性化を認めた。この活性化は、やはり、百日咳毒素前処理、抗 Go 共役配列抗体により阻害を受けたため、病気の変異体もまた、野生型と同様、受容体様に、Go を活性化していること、細胞内ドメインに存在する Go 共役配列を用いて Go の活性化を惹起していることが判明した。これらの結果から、病気の変異体は、Go を構成的に活性化する機能を有することが判明した。

以上、本論文は、アミロイド蛋白前駆体は、Go と共役しうる脳受容体であり、病気の変異に伴い、Go を構成的に活性化する能力を獲得することを示したと言える。これらのことを総合すれば、家族性アルツハイマー病の病因遺伝子群の共通の標的として Go を想定することができ、Go の制御するシステムの理解が、アルツハイマー病の病態理解に連結するものと推定されたことになり、アルツハイマー病の病態理解に役立つ重要な貢献をしたものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。